

# دستور العمل

## آزمایشگاه خون شناسی

مقطع کارشناسی ناپیوسته

با نظارت : آقای دکتر محمد رضا ساروخانی

آقای محمد حسین احمدی

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش : تعیین HbA2

مواد, وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون حاوی ضد انعقاد EDTA , لوله آزمایش, جا لوله ای, سمپلر ۵۰, ۱۰۰, 200ml, سر سمپلر, پیپت پاستور, پیپت 5cc , آب مقطر, اسپکتروفتومتر, بافر جداکننده HbA2, محلول همولیزات , ستون حاوی ژل DE52 , لوله آزمایش بلند

**روش کار:** قبل از شروع کار, ستونها و معرف ها باید به دمای اتاق برسند.

ابتدا باید همولیزت را به روش زیر تهیه نماییم :

50 میکرولیتر از خون گرفته شده را در داخل یک لوله آزمایش کوچک می ریزیم , سپس 250 میکرولیتر از محلول همولیزات را به آن اضافه کرده , خوب تکان می دهیم تا خون کاملاً همولیز شود . همولیز کامل باعث افزایش صحت آزمایش است. پس از ۵ دقیقه همولیز کامل می شود. در غیر اینصورت به کمک فریز کردن , همولیز را کامل می کنیم . ستون های حاوی ژل را برداشته ۲-۳ بار سروته می کنیم تا ژل از قسمت پایین به سمت بالا بیاید. سپس درب فوقانی ستون را باز کرده و به کمک پیپت پاستور متصل به پستانک لاستیکی , ژل داخل ستون را در مایع آن کاملاً شناور و یکنواخت می نمائیم. باید از یکنواخت شدن همه ژل در داخل محلول اطمینان حاصل کنیم. سپس درب زیرین ستون را برداشته و ستون را داخل یک لوله آزمایش قرار می دهیم تا محلول از ژل خارج شده و داخل لوله بریزد چنانچه مایع شفاف رویی در بالای ستون بماند , میتوان با پیپت پاستور آن را خارج نمود.

100 میکرولیتر از همولیزات تهیه شده در بالا را به آهستگی و با کمک یک سمپلر به سطح ژل اضافه می کنیم به طوریکه به اطراف پخش نشود . بلافاصله پس از اضافه کردن همولیزت به ژل داخل ستون, 100 میکرولیتر دیگر از همولیزت را داخل یک لوله آزمایش بلند ریخته و حجم آن را به 15cc می رسانیم (Hb توتال) . پس از گذشت ۵ دقیقه و جذب همولیزت به داخل ژل , ستون را روی یک لوله آزمایش دیگر قرار داده و به آرامی ۲/۵cc از محلول بافر HbA2 را به سطح ژل اضافه می کنیم. به تدریج

HbA2 جدا شده و به طرف پایین حرکت می کند حلقه HbA2 در این حالت قابل مشاهده است. پس از حدود ۲۰ دقیقه، تمام بافر از ستون خارج می شود. سپس به آن ۰/۵ cc آب مقطر اضافه کرد ه ( به لوله حاوی HbA2 ) هر دولوله را هم زده و با استفاده از اسپکتروفتومتر و طول موج ۴۱۵ نانومتر و در مقابل بلانک آب مقطر ، OD لوله HbA2 و لوله Hb توتال را قرائت می نماییم. محاسبه نتیجه بر اساس فرمول زیر است :

$$\%HbA2 = \frac{OD\ HbA2 \times 100}{OD\ HbTotal \times 5}$$

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: Ham's test

هدف از انجام آزمایش : تشخیص PNH

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : سرم نرمال، سرم نرمال غیر فعال شده، سوسپانسیون ۵۰٪ بیمار، سو سپانسیون ۵۰٪ نرمال، پرل شیشه ای، سرم فیزیولوژی، اسید کلریدریک 0.2mol/l، لوله آزمایش

تهیه نمونه خون و سرم بیمار : ۱۰ml خون کامل بیمار را در ارلن مایر حاوی ۱۰ پرل شیشه ای ریخته و به آرامی چرخانده تا رشته های فیبرین جدا شود. خون را به آهستگی در لوله دیگر ریخته و ۵ دقیقه دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ شود. سرم جدا شده و خون ته لوله را با سرم فیزیولوژی چند مرتبه شستشو داده و سوسپانسیون ۵۰٪ تهیه نمایید. روش دیگر تهیه سرم بیمار به این ترتیب است: تهیه پلاسما و افزودن یون کلسیم به آن و دفیبریناسیون پلاسما (سرم بیمار به روش لخته نشود چون طی تشکیل لخته PH کاهش می یابد و احتمال وجود همولیز کاذب وجود دارد).

تهیه نمونه خون و سرم نرمال : یک نمونه خون و سرم نرمال تازه سازگار از نظر ABO تهیه شود. (سرم نرمال را می توان به روش لخته جدا نمود).  
روش کار : مطابق جدول زیر عمل نموده:

شماره لوله	Test(ml)		Control(ml)			
	1	2	3	4	5	6

سرم نرمال	0/5	0/5	0	0/5	0/5	0
سرم نرمال غیر فعال	0	0	0/5	0	0	0/5
HCL(0/2mol/l)	0	0/05	0/05	0	0/05	0/05
سوسپانسیون ۰.۵٪ بیمار	0/05	0/05	0/05	0	0	0
سوسپانسیون ۰.۵٪ نرمال	0	0	0	0/05	0/05	0/05
لیز در نمونه های مثبت	Trace 2%	+++ 30%	-	-	-	-

لوله هارابه مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کرده و سپس ۱۰ دقیقه دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ نمایید.

جهت سنجش کمی لیز: از ۰.۵ میلی لیتر سرم بعنوان بلانک و از ۰.۵۵ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی از هر گروهی به همراه ۰.۵۵ میلی لیتر آب مقطر به عنوان استاندارد استفاده نمایید.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش : سوکروز تست

هدف از انجام آزمایش : تشخیص PNH و آنمی های رفراکتور

مواد ، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : سوکروز، سرم نرمال (همگروه از نظر ABO با خون بیمار)،  
سوسپانسیون ۵۰٪ بیمار، سرم فیزیولوژی، لوله آزمایش

تهیه محلول کار (محلول سوکروز ایزوتونیک): 92/4gr سوکروز را در ۱ لیتر آب مقطر حل نمائید (این  
محلول ۲-۳ هفته در دمای یخچال پایدار است .)

روش کار : دو لوله آزمایش به نام های کنترل و تست برداشته و در هر یک ۰/۵ml سرم نرمال بریزید ،  
سپس به لوله تست 0.85ml محلول سوکروز و به لوله کنترل 0.85ml محلول سالین بیفزائید. به هر یک از  
لوله ها 0/1ml سوسپانسیون ۵۰٪ گلبول های شسته شده بیمار اضافه نمائید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷  
درجه انکوبه نموده و ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمائید. آنگاه لوله ها را از نظر همولیز و تغییر رنگ محلول رویی  
مورد بررسی قرار دهید.

می توان مقدار همولیز را به صورت کمی از طریق اسپکتروفتومتر محاسبه نمود: از سرم رقیق شده در سالین  
بعنوان بلانک واز ۰/۱ml سوسپانسیون حل شده در 0/9ml ammonia (0/4ml/l) بعنوان استاندارد  
استفاده شود.

مقدار نرمال لیز : کمتر از ۱۰٪

مقدار لیز در بیماری PNH: ۱۰-۸۰٪

مقدار لیز در Negative: HEMPAS

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: الکتروفورز Hb

اساس آزمایش : در PH قلیایی (۸/۶)، Hb به علت داشتن شارژ منفی به سمت قطب مثبت (آند) حرکت میکند.

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : بافر tris-EDTA-Boric acid (TEB)، رنگ پانسو S، محلول شفاف کننده، محلول رنگبر، متانول مطلق، نمونه خون حاوی ضد انعقاد EDTA یا هپارین

### معرفها :

- بافر تریس قلیایی (تریس هیدروکسی متیل آمینومتان) : بافر شامل اسیدبوریک، EDTA و tris با PH ۸/۶-۶/۲ است. بافر بصورت پودر تجاری است که مطابق با دستورالعمل همراه با آب مقطر بصورت محلول درآمده و آماده کار می شود.
- معرف همولیزت: شامل ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به همراه ۵۰ میکرولیتر packed cell شسته شده بیمار است.
- رنگ پانسو S: برای رنگ کردن پروتئین های مختلف از جمله Hb از این محلول استفاده میشود.
- محلول شفاف کننده : ۳۰ قسمت اسید استیک گلاسیال را با ۷۰ قسمت متانول مطلق و ۵CC گلیسرول ترکیب نمائید.



• محلول رنگبر : اسید استیک ۱۵٪

**تهیه همولیزت:** نمونه خون را به مدت ۵ دقیقه دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ نموده و پلاسمای آن را جدا کنید. سپس نمونه را با سرم فیزیولوژی ۳ مرتبه شستشو داده و از آن **packed cell** تهیه نمایید آنگاه ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر را با ۵۰ میکرولیتر گلبول شسته شده بیمار مخلوط کرده، ورتکس نمائید تا فرایند لیز کامل شود.

**روش کار:** با توجه به اینکه محیط پایه در الکتروفورز، کاغذ استات سلولز است این محیط در حالت دست نخورده بسیار کننده و غیررسانا است. برای آماده کردن کاغذ، آن را در بافر تریس که در بالا به آن اشاره شده به مدت ۲ دقیقه غوطه ور می کنیم (**soak**) پس از انجام این مرحله کاغذ آماده نمونه گذاری است. بافر اضافی روی کاغذ را توسط یک کاغذ صافی خوب می گیریم به طوری که استات سلولز فقط مرطوب باشد و هیچ بافر اضافی روی آن مشاهده نشود. انجام ندادن این مرحله باعث میشود پس از انجام نمونه گذاری، نمونه ها روی کاغذ پخش شوند و به صورت باند نخواهند بود.

سپس ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه را داخل محفظه نمونه گذاری می ریزیم و با اپلیکاتور مخصوص ۱ میکرولیتر از نمونه برداشته و به کاغذ استات سلولز منتقل می کنیم. بعد از انجام نمونه گذاری کاغذ را به تانک حاوی بافر که از قبل آماده شده منتقل می کنیم.

**آماده سازی تانک الکتروفورز :** تانک شامل دو قسمت یا محفظه یا **chamber** است که هر دو توسط بافر پر میشود (هر قطب میدان در یک **chamber** قرار دارد و برای جلوگیری از اتصال برق بین دو قسمت یک تیغه پلاستیکی وجود دارد) برای اینکه ارتباط الکتریکی بین دو قطب برقرار شود باید پلهای روی هر کدام از چمبر ها تشکیل شود که کاغذ استات روی آنها قرار گرفته و جریان از طریق بافر به پل ها و از آنجا به کاغذ و به تیغ آن به باند های Hb القا شود.

**روش انجام الکتروفورز:** کاغذ استات سلولز طوری روی پل ها قرار می گیرد که قسمت طلق کاغذ که

نارسانا است در سمت بالا و قسمت رسانا در تماس با پل های الکتریکی قرار می گیرد.

نکته : نمونه باید در سمت قطب کاتد (-) قرار داشته باشد چون به دلیل بار منفی Hb, حرکت از سمت

منفی به مثبت انجام می شود.

الکتروفورز در ولتاژ ۳۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام می شود. پس از پایان الکتروفورز استات سلولز جهت

رنگ آمیزی باند ها به مدت ۵ دقیقه در رنگ پانسو S قرار می گیرد.

جهت ادامه مراحل باید زمینه استات سلولز رنگ بری شود و فقط باندها رنگ داشته باشند. برای این منظور

از محلول اسید استیک جهت رنگ بری استفاده می شود ۳ ظرف رنگبر داریم که استات سلولز در هر کدام

به مدت ۵ دقیقه قرار میگیرد (رنگ بری تا زمان بی رنگ شدن کامل زمینه ادامه می یابد).

بعد از رنگبری استات سلولز به منظور فیکس شدن به مدت یک دقیقه در محلول متانول مطلق قرار میگیرد

.نهایتا برای اینکه بتوان باند ها را دانسیتومتری و تعیین مقدار کرد باید سلولز روی طلق حل شده و پایه

شفاف شود برای این منظور استات سلولز به مدت ۱ دقیقه در محلول تازه شفاف کننده قرار می گیرد.

بعد از این مرحله برای شفاف شدن نهایی کاغذ استات سلولز را به مدت ۵ دقیقه در فور ۷۰ درجه قرار

میدهیم (تا جاییکه کاملا محیط شفاف شود).

در مرحله بعد باند ها دانسیتومتری و تعیین مقدار می شوند.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: رنگ آمیزی آهن (واکنش

### آبی پروس یا آزمون پرل)

هدف از انجام آزمایش: تعیین آهن نامحلول (هموسیدرین در سلول های مختلف و از جمله وضعیت ذخیره آهن مغز استخوان )

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : محلول فروسیانور پتاسیم ۴٪، اسید کلریدریک ۴٪، نوترال رد یا اتوزین ۱٪

روش کار : ابتدا لام را بامتانول مطلق فیکس نمائید. سپس حجم مساوی از محلول فروسیانورپتاسیم و اسید کلریدریک را با هم مخلوط نمائید لام را در محلول فوق در داخل بن ماری قرار دهید تا به دمای ۶۰ درجه برسد حال به مدت ۲-۱ دقیقه صبر کنید. آنگاه لام را کاملاً با آب مقطر بشوئید سپس به مدت ۲ دقیقه لام را در رنگ اتوزین

قرار دهید مجدداً با آب مقطر بشوئید و در مجاورت هوا خشک نمائید.  
تذکر: تمام پپیت ها و ظروف مصرفی باید اسید شوی و فاقد آهن باشند.

طریقه گزارش نویسی نتیجه آزمایش:

نتیجه آزمایش به صورت منفی یا ۱+ تا ۵+ گزارش می شود.

در بالغین ۲+ به معنی نرمال، ۳+ افزایش مختصر، ۴+ افزایش متوسط و ۵+ افزایش شدید می باشد.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## بررسی اسمیر مغز استخوان

موارد انجام بررسی مغز استخوان :

- در مبتلایان به کم خونی میکروسیتی به کمک ارزیابی ذخایر آهن
- در مبتلایان به کم خونی ماکروسیتی از نظر وجود یا عدم وجود روند بلوغ مگالوبلاستیک
- در مبتلایان به کم خونی نرموسیتی به کمک بررسی اختلالات کیفی یا کمی دراریتروپوئز
- در نوتروپنی، ترومبوسیتوپنی یا پان سیتوپنی با بررسی سلولهای پیش ساز هر رده
- در اختلالات ایمنوگلوبولین (تشخیص میلوم پلاسما سل یا ماکروگلوبولینمی)
- تشخیص و طبقه بندی لوسمی های حاد، لنفوم ها، تومور های متاستاتیک
- 

آماده سازی اسمیر مغز استخوان : گسترش مغز استخوان را می توان به همان روش معمول برای شمارش خون تهیه کرد و باید با رنگ رومانوفسکی به همان روش رنگ آمیزی گستره خون رنگ نمود. به منظور بررسی ذخایر آهن مغز استخوان از رنگ آمیزی آهن (آزمون **perl**) استفاده می شود.

بررسی مغز استخوان :

۱- سلولاریتی : تراکم سلولی مغز استخوان را به صورت نسبت حجم سلولهای خونساز به کل حجم فضای مغز استخوان (سلولها به اضافه چربی و سایر اجزای استروما) بیان می کنند.

سلولاریته با توجه به سن هر فرد و محل نمونه گیری تفاوت می کند.

در حالت نرمال نسبت سلولاریته به چری در مغز استخوان ۴۸-۷۹٪ است اگر این نسبت کمتر از ۲۵٪ شود

B.M هایپوسلولار است و در صورتی که بیشتر از ۷۵-۸۰٪ باشد B.M هایپرسلولار می باشد.

میزان سلولاریته با توجه به سن : در کودکان ۵۹-۹۵٪، در سن ۳۰ سالگی ۵۰٪ و در سن ۷۰ سالگی ۱۱-۴۷٪ متغیر است.

میزان سلولاریته با توجه به محل نمونه گیری : در سن ۵۰ سالگی سلولاریتی در ستون مهره ها ۷۵٪، در استرنوم ۶۰٪، در کرسٹ ایلپاک ۵۰٪ و دردنده ها ۳۰٪ است.

۲- **توزیع سلولها**: بر اساس تجارب قبلی یا با شمارش افتراقی در ۱۰۰۰-۳۰۰ سلول انجام می شود و درصد هر نوع سلول محاسبه می گردد.

۳- **نسبت میلوئید به اریترئوئید (M/E)**: در سنین نوزادی و کودکی تا حدودی نسبت به سنین دیگر بالاتر است در بالغین این نسبت بین ۱/۲ به ۱ تا ۵ به ۱ متغیر است (متوسط: ۲.۵ به ۱)

۴- **توجه به بلوغ هسته ای و سیتوپلاستی سلولها**

۵- **وجود سلولهای نادر و غیرطبیعی**: ماست سل ها ی سنجی، استئوبلاستها، استئوکلاستها که بیشتر در آسپیره های اطفال مشاهده می شوند.

استئوبلاستها سلولهای بزرگ با هسته مرکزی و کروماتین رتیکولر و هستک مشخص می باشند که سیتوپلاسم آنها کمی بازوفیلی بوده و گاه به صورت مجتمع و شبیه پلاسما سل ها و یا سلولهای میلومایی دیده می شوند.

استئوکلاستها خیلی بزرگ و چند هسته ای و شبیه کلاستر سلولهای متاستاتیک هستند.

۶- **مگاکاریوسیتها** : با عدسی ۱۰۰ به طور متوسط ۱ تا ۳ عدد و در شمارش افتراقی کلی کمتر از ۱٪ دیده میشود.

۷- **شمارش افتراقی**: در بالغین رده نوتروفیل ها ۵۶٪ (به تفکیک : متامیلوسیتها

۱۸٪، میلویتها ۱۲٪، باند ۱۱٪، سگمانته ۱۰/۷٪ و بقیه، دیگر سلولها) و نرموبلاستهای تام ۲۱/۵٪ (که به

تفکیک : پلی کروماتوفیلیک نرموبلاست ۱۲/۴٪، ارتوکرومیک نرموبلاست ۶/۵٪ و بقیه، دیگر سلولها) و

لنفوسیت‌های تام ۱۵/۸٪ و بقیه سلول‌ها شامل پلازما سل‌ها و منوسیت‌ها (هر یک ۱/۸٪) و ائوزینوفیل‌ها ۳/۲٪ و مگاکاریوسیت‌ها کمتر از ۱٪ و سلول‌های رتیکولومی ۰/۳٪ سلول‌های مغز استخوان را تشکیل می‌دهند.

رده نوتروفیلی < رده اریترئیدی < رده لنفوسیتی < رده ائوزینوفیلی < پلاسماسل و منوسیت‌ها < مگاکاریوسیت

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش : رنگ آمیزی میلوپراکسیداز (متد 3' و 3 دی آمینوبنزیدین)

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : بافر نرمال استون 3 و 3 دی آمینوبنزیدین، بافر سورنسن فسفات ،  
H2O2، هماتوکسیلین

معرف ها :

فیکساتیو : بافر نرمال استون (BFA)

سوبسترا: 3 و 3 دی آمینو بنزیدین (DAB 3 و 3)

بافر : بافر سورنسن فسفات با PH: 7/3 - H2O2

رنگ زمینه: هماتوکسیلین

تهیه محلول کار: مقدار 30mg دی آمینو بنزیدین را در 60ml بافر سورنسن فسفات مخلوط کرده و

۱۲۰ میکرولیتر H2O2 به آن بیفزائید و خوب مخلوط کنید.

**روش کار:** اسمیر خشک شده را به مدت ۳۰ ثانیه در بافر نرمال استون قرار دهید تا نمونه فیکس شود آنگاه لام را با آب جاری شستشو داده و اجازه دهید تا خشک شود. سپس آنرا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول کار قرار دهید.

حال لام را به مدت ۱-۵ دقیقه با هماتوکسیلین رنگ آمیزی کرده و با آب جاری شستشو دهید سپس آنرا خشک نمائید.



بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش : رنگ آمیزی سودان بلک B

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : فرمالدئید، رنگ سودان بلک B، فسفات هیدروژن دی سدیک، رنگ  
گیمسا، اتانول مطلق، فنل کریستال

### معرفها :

- فیکساتیو : محلول فرمالدئید ۴۰٪
- رنگ سودان بلک B: ۰/۳ گرم سودان بلک در 100ml اتانول مطلق حل شود.
- محلول تامپون : ابتدا ۰/۳ gr فسفات هیدروژن دی سدیم هیدراته ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{po}_4.12\text{H}_2\text{O}_2$ ) را در 100ml آب مقطر حل کنید. سپس 16gr فنل کریستال را در 30ml اتانول مطلق حل کنید و این محلول را با محلول فسفات هیدروژن دی سدیم مخلوط نمائید.
- محلول کار : 40ml بافر را به 60ml محلول سودان بلک B اضافه کنید.
- رنگ زمینه : گیمسا

**روش کار:** اسمیر خشک شده را در مجاورت بخار فرمالین فیکس کرده، بدین منظور گسترش را به مدت ۱۵ دقیقه در ظرفی که حاوی ۲ قطره فرمالین 40% است قرار دهید، سپس اسلاید را به مدت ۱ ساعت در ظرف حاوی محلول کار قرار دهید. آنگاه اسلاید را در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه شناور نموده، اینکار را ۳ مرتبه تکرار کنید.

حال لام را با آب جاری شستشو داده و در پایان با رنگ گیمسا رنگ آمیزی نمائید.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش : رنگ آمیزی استر از غیر اختصاصی ( $\alpha$ - نفتیل استات استراز )

مواد، و وسایل تجهیزات مورد نیاز : استون فرمالین ،  $\alpha$  - نفتیل استات ، بافر فسفات، همتوکسیلین ، اتیلن ، نیتريت سدیم ، آب مقطر ، پاراروزانیلین

### معرف ها :

- فیکساتیو: استون فرمالین
- تامپون : بافر فسفات (PH:6.3)66mmol/l
- محلول سوبسترا : 100mg ،  $\alpha$  نفتیل استات را در ۵ml اتیلن منومتیل حل کنید. (در دمای ۴-۱۰ درجه نگهداری شود. )
- رنگ زمینه : همتوکسیلین

### Coupling reagent:

- 1- استوک پاراروزانیلین : ۱ گرم پاراروزانیلین را در ۲۵ml 2mol/l Hcl، گرم حل کنید و پس از سرد شدن آن را از صافی عبور دهید. (به مدت ۲ ماه در دمای اتاق قابل نگهداری است)
- ۲- محلول ۴٪ نیتريت سدیم : ۲۰۰ میلی گرم نیتريت سدیم را در 5cc آب مقطر حل کنید (این محلول به مدت ۱ هفته در 4-10 درجه پایدار است).
- ۳- پاراروزانیلین هگزازوتایزد: حجم های برابر از پاراروزانیلین و نیتريت سدیم ۴٪ را باهم ترکیب نمائید. (این محلول ۱ دقیقه قبل از مصرف آماده شود. )

**مخلوط انکوباسیون :** ۲ml محلول  $\alpha$ -نفتیل استات را با ۳۸ ml بافر فسفات 66mol/l ترکیب نموده و خوب تکان دهید. سپس ۴ml/۰ پاراروزانیلین هگزازوتایزد تازه تهیه شده را به آن افزوده و خوب مخلوط کنید.

**روش کار :** اسمیر خشک شده را در بافر استون فرمالین به مدت ۳۰ ثانیه فیکس کنید. سپس آنرا با آب جاری شستشو داده و اجازه دهید لام در مجاورت هوا خشک شود. اسلاید را به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در ظرف حاوی مخلوط انکوباسیون قرار دهید. آنگاه اسلاید را در ظرف آب قرار داده تا کاملاً پاک شود سپس آنرا خشک کنید. در پایان لام را به مدت ۲-۵ دقیقه توسط هماتوکسیلین رنگ آمیزی کنید.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش : اندازه گیری فیبرینوژن

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز : پلاسمای کالیبره، ترومبین، پلاسمای بیمار، کورنومتر، لوله آزمایش

روش کار: ابتدا رقت های استاندارد، کنترل، و پلاسمای بیمار را طبق جدول زیر تهیه نمایید:

بافر	پلاسما	رقت استاندارد
800µl	200µl استاندارد	۱:۵
500µl	500µl رقت ۱:۵ استاندارد	۱:۱۰
500µl	500µl رقت ۱:۱۰ استاندارد	۱:۲۰
500µl	500µl رقت ۱:۲۰ استاندارد	۱:۴۰
900µl	100µl پلاسما	بیمار یا کنترل

از هر غلظت 50 میکرو لیتر در لوله های دیگری ریخته و ۱-۲ دقیقه در ۳۷ درجه قرار دهید. سپس 25µl

معرف ترومبین به آنها اضافه نمائید و زمان لخته شدن را اندازه بگیرید و منحنی آن را رسم کنید.

در لوله تست 50µl پلاسمای بیمار با رقت ۱:۱۰ ریخته و ۱-۲ دقیقه در ۳۷ درجه قرار دهید. سپس 25µl

معرف ترومبین به آن اضافه نمائید و زمان لخته شدن را اندازه بگیرید.

مقدار نرمال : 150-350mg/dl (1.5-3.5g/l)

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: FDP

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون بیمار، بافر گلیسین، اسلاید شیشه ای، ترومبین (100u(NIH)/ml)، کیت تست، لوله آزمایش

روش کار: لوله حاوی خون را در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده تا retraction لخته صورت گیرد سپس لوله را سانتریفوژ کرده و سرم بیمار را جدا نمائید. (می توان از ترومبین جهت تسریع لخته شدن استفاده کرد).

رقت های ۱/۵، ۱/۲۰ از سرم بیمار در بافر گلیسین تهیه شود. ۱ قطره از هر رقت را با ۱ قطره از سوسپانسیون لاتکس موجود در کیت روی یک اسلاید شیشه ای ترکیب نمائید و پس از ۲ دقیقه حرکت دورانی، آن را از نظر آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار دهید.

### طریقه گزارش:

- اگر آگلوتیناسیون در رقت ۱/۵ مثبت شود، FDP: 10µg/ml گزارش می شود.
- اگر آگلوتیناسیون در رقت ۱/۲۰ مثبت شود، FDP: 40µg/ml گزارش می شود.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: D-Dimer

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: پلاسمای بیمار، کیت تست، اسلاید شیشه ای

روش کار : 20 میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و پلاسمای بیمار را با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون لاتکس روی یک اسلاید شیشه ای ترکیب نموده و حرکت دورانی دهید و نتیجه را از نظر آگلوتیناسیون بین ۱۸۰-۲۰۰ ثانیه مورد بررسی قرار دهید.

طریقه گزارش : آگلوتیناسیون مثبت به صورت

D-Dimer>250 نانوگرم در میلی لیتر گزارش می شود.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

# نام آزمایش: اندازه گیری HbF به روش Modified Betke

هدف از انجام آزمایش: تعیین سطح کمی HbF در ارزیابی تالاسمی ها و هموگلوبینوپاتی ها

اصول آزمایش: اساس این روش بر پایداری HbF در محیط قلیایی استوار است. ساختمان پروتئینی سایر هموگلوبین ها در شرایط قلیایی تغییر کرده وبا سولفات آمونیوم رسوب می کند ولی HbF بصورت محلول باقی می ماند.

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: هیدروکسید سدیم 1.2 نرمال (4/8g/dl)، سولفات آمونیوم اشباع، آب مقطر، درابکین، خون حاوی ضد انعقاد EDTA، تترا کلرید کربن (CCL4)، کاغذ صافی، لوله آزمایش، قیف شیشه ای

تهیه محلول همولیزا: ابتدا نمونه خون بیمار را ۳ مرتبه شستشو داده و از آن packed cell تهیه نمایید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر packed cell را با ۴ ml محلول درابکین ترکیب نمایید و ۲-۳ دقیقه صبر کنید تا کاملاً گلبولها لیز گردد (محلول حاصل را همولیزا می نامیم).

**روش کار:** در یک لوله تمیز به نام لوله HbF , مقدار 2.8ml محلول همولیزا ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر محلول NaOH به آن افزوده , کاملا مخلوط نمایید و حداقل ۲ دقیقه صبر کنید تا واکنش انجام شود. آنگاه 2ml محلول هیروکسید سدیم اشباع به آن بیفزائید و خوب مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ نمایید. سپس محلول رویی را سریعاً داخل لوله تمیز خالی کرده و آن را از کاغذ صافی عبور دهید.

**لوله Total Hb:** همزمان در لوله دیگری مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از محلول همولیزا ریخته و 6.75ml آب مقطر به آن بیفزایید و کاملاً مخلوط کنید.

حال اسپکتروفتومتر را با آب مقطر صفر کرده و جذب نوری نمونه موجود در لوله هارا در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت کنید. همچنین جذب نوری سولفات آمونیوم اشباع را نیز به تنهایی قرائت نموده و آن را ODR3 بنامید.

طریقه محاسبه:

$$\%HbF = \frac{OD\ HbF - OD\ R3}{OD\ Hb\ total} \times 10$$

**مقادیر نرمال:** مقدار نرمال HbF در بالغین کمتر از ۲٪ هموگلوبین تام می باشد.



بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: Heinz body

هدف از انجام آزمایش: تعیین رسوب Hb ناپایدار از (دنا توره) بویژه در تشخیص کمبود G6PD

مواد ، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون حاوی ضد انعقاد EDTA، متیل و یوله (۰/۵gr در ۱۰۰ml

سرم فیزیولوژی)

روش کار: ۱ حجم خون را با ۴ میتل و یوله ترکیب نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در اتاق قرار دهید سپس از

آن اسمیر تهیه نمایید.

لام را در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی بالا مشاهده نمایید. اجسام هاینز در زیر میکروسکوپ به

صورت اینکلوژنهای آبی رنگ با سایز  $1-3\text{ }\mu\text{m}$  و به تعداد یکی یا بیشتر در گلبولهای قرمز دیده می شود.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: HbH

هدف از انجام آزمایش: تعیین رسوب تترامر زنجیره بتا (B4) در گلبولهای قرمز در شناسایی آلفا

تالاسمی ها

مواد ، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون حاوی ضد انعقاد EDTA، برلیانت کرزیل بلو (۱۰ g/l) یا

نیومتیلن بلو (۲۰ g/l)، لوله آزمایش

روش کار: در یک لوله آزمایش ۲ حجم از خون حاوی ضد انعقاد EDTA را با یک حجم بریلیانت کرزیل

بلو مخلوط کرده و به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه یا ۴ ساعت در دمای اتاق قرار دهید . سپس از آن

اسمیر تهیه نمایید. و در زیر میکروسکوپ با عدسی روغنی مشاهده نمایید. HbH به صورت اینکلوزنهای

متعدد به رنگ سبز- آبی در گلبول قرمز دیده می شود که اصطلاحاً Golf ball نام دارد و باید از

رتیکولوسیت که حاوی رسوبات زنجیره ای و خشن و نامنظم است افتراق داده شود.

مقادیر:

$\alpha$ -Thalassaemia trait: 0/01-1%

Haemoglobin H disease ( $\alpha$  thalassaemia- $\alpha$  thalassaemia): >10%

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: sickling test

هدف از انجام آزمایش: شناسایی HbS

مواد ، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون حاوی ضد انعقاد EDTA، دی تیونیت سدیم (Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

O<sub>4</sub>)، پارافین، فسفات دی سدیک (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، لام شیشه‌ای، لامل

تهیه محلول کار: ۲ حجم دی تیونیت سدیم با غلظت 0.۱۱۴ مول در لیتر (19/85g/l) را با ۳ حجم

فسفات دی سدیک با غلظت ۰/۱۱۴ مول در لیتر (16/2g/l) ترکیب کرده و PH را به 6/8 برسانید ( این

محلول قبل از انجام تست تهیه شود و قابل نگه داری نیست.)

روش کار: روی یک لام شیشه‌ای، ۵ قطره محلول کار و ۱ قطره خون حاوی ضد انعقاد ریخته و لامل را

روی آن قرار داده و با لاک یا پارافین دور لامل مسدود گردد.

تفسیر آزمایش: در بیماری سیکل سل، گلبولهای قرمز به علت حضور Hbs و کاهش حلالیت در فشار

پایین اکسیژن، فرم طبیعی خود را از دست داده و داسی شکل می‌شوند. در بیماری Hbs trait ممکن

است پس از ۱۲ ساعت گلبولهای قرمز، سیکل شوند ولی در حالت هموزیگوت، سلولها پس از ۱ ساعت

انکوباسیون در ۳۷ درجه داسی شکل می‌شوند.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: رنگ آمیزی کلایه‌هاور (kleihauer):

هدف از انجام آزمایش: تعیین توزیع HbF در سلولهای سرخ (سیتوشیمی Hb در گلبولهای قرمز)

مواد ، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: اتانول 80%، اریروژین 1gr/l یا ائوزین 2/5gr/l، هماتوکسیلین

(7.5gr در ۱ لیتر اتانول ۹۰) ، کلروفریک (FeCl<sub>3</sub>) ، اسید کلریدریک (2/5mol/l)

تهیه مخلوط FeCl<sub>3</sub> و 24gr:HCl کلروفریک و 20ml اسید کلریدریک در ۱ لیتر آب مقطر حل شود.

تهیه محلول elution : ۵ حجم از محلول هماتوکسیلین و ۱ حجم مخلوط FeCl<sub>3</sub> و HCl را به خوبی

مخلوط کرده، PH تقریباً ۱/۵ خواهد بود (این مخلوط ۴ هفته قابل نگه داری است).

روش کار: پس از تهیه اسمیر خون محیطی و خشک شدن، آن را به مدت ۵ دقیقه در اتانول 80% فیکس

کرده سپس به سرعت در آب جاری شستشو داده و به طور عمودی بر روی کاغذ خشک کن به مدت ۱۰

دقیقه قرار دهید تا خشک شود. آن‌گاه لامها را به مدت ۲۰ ثانیه در محلول elution قرار داده و سپس آنرا با آب شسته و در آخر به مدت ۲ دقیقه در اریتروزین یا ائوزین رنگ‌آمیزی کنید و با آب جاری شستشو دهید و خشک نمائید.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: LE cell

مواد ، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون دفیبرینه بیمار، پرل شیشه‌ای، متانول، رنگ رومانوفسکی،

شیکر، لوله آزمایش، لوله هماتوکریت

روش کار: 1ml خون را در یک لوله آزمایش ریخته و ۴ پرل شیشه‌ای در آن انداخته و سر لوله را با

درپوش پلاستیکی محکم کرده، توسط شیکر در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه با 33 دور در دقیقه

بچرخانید. سپس آن را 10-15 دقیقه در ۳۷ درجه گذاشته و محتویات لوله را به یک لوله HCT و نیتروپ

منتقل نموده و پس از ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ با دور 150-200g از لایه بافی کوت گسترش تهیه شود. پس از

خشک شدن لام آن را با متانول خالص fix کرده و با رنگ‌های رومانوفسکی رنگ‌آمیزی نمایید.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: solubility test

هدف از انجام آزمایش: تست تأییدی و افتراقی در هموگلوبینوپاتی HbS

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: خون حاوی ضد انعقاد EDTA، فسفات هیدروژن دی پتاسیم

( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ )، ساپونین، دی تیونیت سدیم ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ )

، لوله آزمایش

تهیه محلول کار: ابتدا 215gr فسفات هیدروژن دی پتاسیم را در آب حل کرده و فسفات دی هیدروژن

پتاسیم به مقدار 169gr به آن افزوده شود، آنگاه دی تیونیت سدیم 5gr را به آن اضافه نموده و در پایان

1gr ساپونین می افزاییم و با آب به حجم 1lit می رسانیم.

روش کار: در یک لوله آزمایش 2ml از محلول کار و 10 میکرولیتر packed cell بیمار را خوب

مخلوط کرده و 5 دقیقه در دمای اتاق قرار دهید سپس لوله را در مقابل یک کاغذ سفید قرار داده و کدورت

آن را با یک نمونه نرمال مقایسه کنید در حالت نرمال باید محلول به رنگ صورتی یا قرمز باشد ولی در بیماری



سیکل سل, HbS به علت عدم قابلیت حل شدن در بافر فسفات با مولاریته بالا, ایجاد کدورت در محلول می‌نماید ، در صورتی که به مثبت بودن نمونه مشکوک شدید لوله را به مدت 5 دقیقه دور 1200 سانتریفوژ نمائید. در نمونه مثبت پس از سانتریفوژ یک باند قرمز تیره در بالای محلول تشکیل می شود در حالیکه محلول زیرین بیرنگ و یا صورتی است.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه هماتولوژی

## نام آزمایش: اتوهمولیز

مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز: محلول گلوکز (100gr/l)، خون دفیبرینه، لوله آزمایش

روش کار: دو لوله به نامهای کنترل و تست آماده نموده، در لوله کنترل 1-2ml خون دفیبرینه نرمال و در

لوله تست 1-2ml خون دفیبرینه بیمار بریزید سپس به هر دو لوله 50-100µl محلول گلوکز 100gr/l

بیفزایید و در ۳۷ درجه انکوبه نمایید، پس از گذشت ۲۴ ساعت لوله‌ها را به آرامی تکان داده و پس از

گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون، لوله‌ها را سانتریفوژ کرده و جذب نوری سرم رویی را توسط اسپکترو

فتومتر در طول موج 540 نانومتر قرائت نمایید.

در این آزمایش سرم بیمار پیش از انکوباسیون به عوان بلانک استفاده می‌شود و لوله استاندارد رقت ۱/۱۰۰

یا ۱/۲۰۰ خون تام درابکین است.

مقادیر نرمال: بدون گلوکز: 0.2-2%

با گلوکز: ۰-۰.۹%